

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年9月18日 (18.09.2003)

PCT

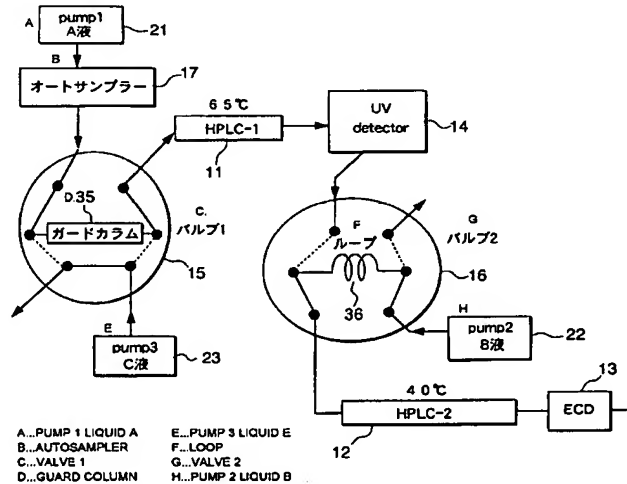
(10) 国際公開番号
WO 03/076925 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 30/88, B01D 15/08, C12Q 1/68 (71) 出願人 および
(72) 発明者: 葛西 宏 (KASAI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒807-0805
福岡県 北九州市 八幡西区光貞台 2-2 5-5 Fukuoka
(JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/03007
- (22) 国際出願日: 2003年3月13日 (13.03.2003) (74) 代理人: 志賀 正武, 外 (SHIGA, Masatake et al.); 〒
169-8925 東京都 新宿区 高田馬場三丁目 2 3 番 3 号
OR ビル Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-070836 2002年3月14日 (14.03.2002) JP
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF PURIFYING OXIDATIVELY INJURED GUANINE NUCLEOSIDE, METHOD OF MEASURING THE SAME AND ANALYZER FOR THE EMBODIMENT THEREOF

(54) 発明の名称: 酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法、その測定方法、及びこれらを実施するための分析装置



(57) Abstract: It is intended to provide a highly accurate, reproducible, economically advantageous and eco-friendly method of purifying an oxidatively injured guanine nucleoside; a method of measuring the same; and an analyzer for embodying these methods. Namely, a method of purifying an oxidatively injured guanine nucleoside formed by an injury to guanine in DNA or RNA which is characterized by having the first purification step of purifying the oxidatively injured guanine nucleoside in a sample by anion exchange chromatography. A method of purifying 8-OH-dG contained in a sample characterized in that 8-OH-rGuo is preliminarily added to the sample followed by the purification. A method of measuring oxidatively injured guanine nucleoside characterized by having the measurement step of measuring oxidatively injured guanine nucleoside having been purified by the above-described purification method.

(57) 要約: 本発明は、高精度で、再現性があり、且つ経済性および環境面に配慮した酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法、その測定方法、及びこれらを実施するための分析装置を提供することを目的とする。DNA又はRNA中のグアニンが損傷を受けた結果生じる酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法であって、試料中に含まれる酸化的損傷グアニンヌクレオシドを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製する第1の精

[続葉有]



TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

添付公開書類:
— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

製工程を有することを特徴とする酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法。試料中に含まれる 8-OH-dG の精製方法であって、予め、試料に 8-OH-rGuo を加えて、精製することを特徴とする 8-OH-dG の精製方法。上記精製方法によって得られた精製酸化的損傷グアニンヌクレオシドを測定する測定工程を有することを特徴とする酸化的損傷グアニンヌクレオシドの測定方法。

明細書

酸化損傷グアニンヌクレオシドの精製方法、その測定方法、
及びこれらを実施するための分析装置

技術分野

本発明は、酸化損傷グアニンヌクレオシド、特に8-ヒドロキシデオキシグアノシン（以下、8-OH-dGと略す）の精製方法、その測定方法、及びこれらを実施するための分析装置に関する。

背景技術

近年、生体内での活性酸素の作用について多くの研究がなされている。通常、活性酸素は生体内に異物が侵入した際、防御システムとして働いている。しかしながら、食品添加物（発ガン性物質）、大気汚染、喫煙、ストレス等によって過剰に活性酸素が発生すると、それらはDNAの損傷を引き起こし、酸化損傷DNA産物の一種である8-OH-dGを生成する。この8-OH-dGは突然変異を誘発し、発癌過程で重要な役割を演じていると考えられている。また、活性酸素は、発癌だけでなく様々な疾患や老化の原因として注目されている。

そのため、生体内における活性酸素量を知ることにより、個人個人の発癌リスク評価や、活性酸素関連の様々な疾患の予測・診断、老化度、あるいは一般健康の評価を行うことができる。

しかしながら、生体内における活性酸素は不安定であり、それらを直接検出するのは困難である。そのため、活性酸素の指標として活性酸素によって生成される8-OH-dGを測定することが提案されている。

これまでに報告されている8-OH-dGの分析方法は6種類に大別できる。（1）8-OH-dGに対する抗体を結合させたアフィニティカラムで精製した分画をHPLC-ECDで分析する方法、（2）3本又は4本のカラムを接続してカラムスイッチング法により、最終的に8-OH-dGをHPLC-ECDにより検出する方法、（3）ELISA法により尿を直接分析する方法、（4）GC-MS（内部標準物質が必要）による方法、（5）LC-MS-MS（内部標準物質が必要）による方法、（6）サンプリングインジェクター（一定分画を分取し、攪拌後、一定量をカラムに注入する装置）を介してマルチファンクションカラム（逆相カラム、陽イオン交換カラムの機能を併せ持つゲル濾過カラム）と、逆相カラムを接続しECDにより検出する方法が挙げられる。

しかしながら、（1）の方法は回収率が低いため、尿中濃度を計算するのに放射性の内部標準物質を用いる必要がある。

また、（2）の方法は前処理が煩雑である。また、バルブ切り替えのタイミングの決定が困難であり、8-OH-dGのピーク付近に夾雑物が

出ることが多い。また、多量の溶離液、洗浄液が必要となるだけでなく、多量の有毒の廃液が生じるため環境面においても好ましくない。

また、(3)の方法は、特異性に問題があり、再現性がよくない。

また、(4)および(5)の方法は、測定機器が高価であり経済的に好ましくなく、さらに回収率が不安定なため内部標準物質を必要とするが、それらは入手困難なものである。

また、(6)の方法は、一検体あたりの分析時間が165分と長く、連続運転による大量処理が困難である。さらに、クロマトグラフィーによる分析の際、8-OH-dGのピークに重なるような夾雑物が検出される確率が高い。そのため、いずれの方法においても測定の精度が不十分である。本発明は、高精度で、再現性があり、且つ経済性および環境面に配慮した酸化的損傷グアニンヌクレオシド、特に8-OH-dGの精製方法、その測定方法、及びこれらを実施するための分析装置を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者は、陰イオン交換カラムを用いることにより8-OH-dG、8-ヒドロキシグアノシン（リボヌクレオシド）（以下、8-OH-rGuoと略す）等の酸化的損傷グアニンヌクレオシドを特異的に吸着・回収できることを見出した。更に、8-OH-dGにおいては、8-OH-rGuoを内部標準マーカースとして用いることにより8-OH-dGを正確に分取できること、その結果、8-OH-dGを高精度で、且つ再現性よく測定でき、さらに経済性および環境面にも優れていることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明の酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法は、DNA又はRNA中のグアニンが損傷を受けた結果生じる酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法であって、試料中に含まれる酸化的損傷グアニンヌクレオシドを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製する第1の精製工程を有することを特徴とする。また、上記酸化的損傷グアニンヌクレオシドが8-OH-dGであることが好ましい。本発明の8-OH-dGの精製方法は、試料中に含まれる8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）の精製方法であって、予め、試料に8-ヒドロキシグアノシン（リボヌクレオシド）（8-OH-rGuo）を8-OH-dGの内部標準マーカースとして加えて、精製を行うことを特徴とする。本発明の8-OH-dGの精製方法は、試料中に含まれる8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）の精製方法であって、予め、試料に8-ヒドロキシグアノシン（リボヌクレオシド）（8-OH-rGuo）を加えて、該試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製する第1の精製工程と、第1の精製工程で得られた8-OH-dGを含有する画分を逆相クロマトグラフィーによって更に精製する第2の精製工程とを有することを特徴とする。また、上記酸化的損傷グアニンヌクレ

オシドの精製方法において、試料が尿であることが好ましい。また、上記 8-OH-d G の精製方法において、試料が尿であることが好ましい。本発明の酸化的損傷グアニンヌクレオシドの測定方法は、更に、上記精製方法によって得られた精製酸化的損傷グアニンヌクレオシドを測定する測定工程を有することを特徴とする。本発明の 8-OH-d G の測定方法は、更に、上記精製方法によって得られた精製 8-OH-d G を測定する測定工程を有することを特徴とする。また本発明の 8-OH-d G の測定方法は、前記精製 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-d G) の測定が、陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて (1) リボヌクレオシド 8-OH-r G u o のピーク認識、(2) 一定時間後の 8-OH-d G 分取開始、(3) 一定時間後の 8-OH-d G 分取終了、(4) 適宜、8-OH-d G 分画のミキシング、の順序で行われ、ついで、逆相カラムへ注入して行われることを特徴とするものである。

本発明の分析装置は、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-d G) の精製および測定を実施するための装置であって、

試料中に含まれる 8-OH-d G を特異的に吸着する陰イオン交換カラム (HPLC-1) と、

8-ヒドロキシグアノシン (リボヌクレオシド) (8-OH-r G u o) の溶出位置を感知する UV 検出器と、陰イオン交換カラム (HPLC-1) から得られた 8-OH-d G を含有する画分を更に精製する逆相カラム (HPLC-2) と、逆相カラム (HPLC-2) から得られた精製 8-OH-d G を測定する検出器とを具備することを特徴とする。

本発明の制御プログラムは、試料中に含まれる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-d G) をカラムクロマトグラフィーにより回収する処理を制御するためのプログラムであって、予め試料中に加えておいたマーカー (8-OH-r G u o) のピークシグナルを UV 検出器より受け、一定時間後の 8-OH-d G 溶出時にサンプラーに接続されたバルブを開くシグナルを出力し、分取を開始し、更に一定時間後に分取終了シグナルを出力し、次いで、得られた 8-OH-d G 分画を第二の精製カラムへ注入するためのシグナルを出力し、カラムから溶出する被検出物質 (8-OH-d G) を精製・回収する処理をコンピュータに行わせることを特徴とする。

図面の簡単な説明

図 1 は、8-OH-d G の精製、測定を実施するための装置の一実施形態を示す模式図である。

図 2 は、8-OH-d G の精製、測定を実施するための装置の一実施形態を示す模式図である。

図 3 は、陰イオン交換カラム (HPLC-1) による尿と 8-OH-d G と 8-OH-r G u o との混合物の分離パターンの一例であり、マーカー

一の位置確認を示す。

図4は、陰イオン交換カラム（HPLC-1）によるヒト尿の分離パターンの一例を示す。

図5は、逆相カラム（HPLC-2）によるヒト尿の分離パターンの一例を示す。

図6は、陰イオン交換カラム（HPLC-1）によるヒト尿の分離パターンの一例を示す。

図7は、逆相カラム（HPLC-2）によるヒト尿の分離パターンの一例を示す。

図8は、逆相カラム（HPLC-2）によるラット尿の分離パターンの一例を示す。

図9は、逆相カラム（HPLC-2）によるラット尿の分離パターンの一例を示す。

符号の説明

- 1 1 陰イオン交換カラム（HPLC-1）
- 1 2 逆相カラム（HPLC-2）
- 1 3 検出器
- 1 4 UV検出器
- 1 5 スイッチングバルブ
- 1 6 スイッチングバルブ
- 1 7 オートサンプラー
- 2 7 サンプリングインジェクター

発明を実施するための最良の形態

本発明は、生体内における活性酸素量を評価するために、その指標となる酸化損傷グアニンヌクレオシド、特に8-OH-dGを精度よく測定するための精製方法、その測定方法およびこれらを実施するための分析装置である。

8-OH-dGをはじめ酸化損傷ヌクレオシドとは、生体内の活性酸素（酸素ラジカル）等によってDNAやRNAが損傷を受けた結果生じるものであり、活性酸素の指標として用いられる。8-OH-dG以外の酸化損傷ヌクレオシドとしては、2-ヒドロキシデオキシアデノシン（2-OH-dA）、5-ヒドロキシデオキシシチジン（5-OH-dC）、5-ホルミルデオキシウリジン（5-CHO-dU）、8-OH-rGuo等が挙げられる。これら酸化損傷ヌクレオシドは、不要物として尿により生体外へ排出される。また、これらのうち8-OH-dG、8-OH-rGuo等の酸化損傷グアニンヌクレオシドは負の電荷を帯びているため、後段で説明する陰イオン交換カラムにより容易に精製、回収することができる。これらの中でも活性酸素の指標として、特に8-OH-d

Gを用いることが好ましい。なお、本明細書における酸化損傷グアニンヌクレオシドとは、DNA又はRNA中のグアニンが活性酸素によって損傷を受けた結果生じるものであり、酸化損傷とはヒドロキシル化されることを示す。

本発明の酸化損傷グアニンヌクレオシド（8-OH-dGを含む）の精製方法、及び測定方法に使用される試料としては、尿、血清、髄液、唾液、細胞培養後の培地等、全ての生体試料を挙げることができる。これらの中でも、尿は採取し易く、また尿中で酸化損傷グアニンヌクレオシドは安定であるため、特に尿が好ましい。

以下、本発明の精製方法、測定方法、及びこれらを実施するための分析装置について、8-OH-dGに則して説明する。

本発明の実施形態に係る8-OH-dGの精製及び測定を実施するための装置は、8-OH-dGを特異的に吸着する陰イオン交換カラム（HPLC-1）と、8-OH-dGの溶出位置の指標となる8-OH-rGuoを感知するUV検出器と、陰イオン交換カラム（HPLC-1）から得られた8-OH-dGを含有する画分を更に精製する逆相カラム（HPLC-2）と、逆相カラム（HPLC-2）から得られた精製8-OH-dGを測定する検出器を具備する。図1は、分析装置の一例を示す模式図である。図中符号11は陰イオン交換カラム（HPLC-1）であり、UV検出器14、カラムスイッチングバルブ16を介して、逆相カラム（HPLC-2）12と接続している。また、陰イオン交換カラム（HPLC-1）11の上流には、試料を注入するオートサンプラー17が接続されたカラムスイッチングバルブ15が接続している。

また、カラムに吸着した分子を溶出するための溶離液（陰イオン交換カラム（HPLC-1）11に用いられる溶離液をA液、逆相カラム（HPLC-2）12に用いられる溶離液をB液とする）、上記カラムスイッチングバルブ15に接続されたガードカラム（陰イオン交換カラム（HPLC-1）11と同一の陰イオン交換樹脂を充填）を洗浄するための洗浄液（C液）を各カラムに送り込むためのポンプ21、22、23が設けられ、ポンプ21はオートサンプラー17、ポンプ22はカラムスイッチングバルブ16、ポンプ23はカラムスイッチングバルブ15に各々接続されている。

なお、図1において、オートサンプラー17の代わりに、8-OH-rGuoのピーク感知により、カラムスイッチングバルブ16を自動的に作動させる機能を持つサンプリングインジェクター（「231XL」、ギルソン製）等を用いることができる。

なお、この方法を実施するために、231XLに新たなプログラムを搭載して測定を行った。このプログラムは、（1）リボヌクレオシド8-OH-rGuoのピーク認識、（2）一定時間後の8-OH-dG分取開始、（3）一定時間後の8-OH-dG分取終了、（4）HPLC-2への注入を行うものである（図6を参照）。より詳しくは、以下のフローにより機能を実現している。

- (1) 2 3 1 XLにより試料をHPLC-1に注入する。
- (2) 設定時間 (T1) だけシステムを待機させる。
- (3) 2 3 1 XLがUV検出器シグナルのモニターを開始する。
- (4) 設定UVレベルを超える (ピーク感知) まで、システムを待機させる。

(5) ピーク感知後、設定時間 (T2) だけシステムを待機させた後、バルブへ接点信号を出力し、ループ内に分取を開始する。

(6) 設定時間 (T3) 後、バルブへ接点信号を出力し、分取を終了させると同時にループ内の分画をHPLC-2に注入する。

後段でも説明するが、サンプリングインジェクター (「2 3 1 XL」、ギルソン製) によれば、8-OH-r Gu oとの相対的位置により自動的に8-OH-d Gの分取範囲 (時間) が決定されるため、予め、8-OH-d Gの分取範囲 (時間) を設定しておく必要がない。

上記陰イオン交換カラム (HPLC-1) 1 1は、試料中に含まれる8-OH-d Gを特異的に吸着するので回収率が非常に高く、且つほとんどの夾雑物を取り除くことができるため、不純物の少ない画分を得ることができる。また、上述したように、陰イオン交換カラム (HPLC-1) 1 1によれば、負の電荷を帯びている8-OH-r Gu o等の酸化的損傷グアニンヌクレオシドにおいても、容易に精製、回収することができる。陰イオン交換カラム (HPLC-1) 1 1としては、陰イオン交換樹脂を充填剤としたものであれば、特に制限はない。具体的な充填剤としては、スチレンジビニルベンゼン系ポリマーに4級アンモニウム基が結合したもの、ポリヒドロキシメタクリレート系ポリマーに4級アンモニウム基が結合したもの等が挙げられる。また、市販品の充填剤としては、アミネックスHPX-7 2 S (BioRad製)、Shodexカラム充填剤 (昭和電工 (株) 製)、MCI GEL CA08F (三菱化成 (株) 製)、ハミルトンRCX-10) 等を挙げることができる。

また、陰イオン交換樹脂の粒子径としては、7~12 μ m程度であることが好ましい。

上記陰イオン交換樹脂を充填するカラムの内径は、特に制限はないが、約1 mm~1.5 mm程度であることが好ましい。また、カラムの内径が2.0~4.6 mmの場合は、図2に示すように、カラムスイッチングバルブ1 6に接続したサンプリングインジェクター2 7 (「2 3 3 XL」、ギルソン製等) を用いて8-OH-d Gを含有する画分を自動的に逆相カラム (HPLC-2) 1 2に注入することが好ましい。なお、この方法を実施するために、2 3 3 XLに新たなプログラムを搭載して測定を行った。このプログラムは、(1) リボヌクレオシド8-OH-r Gu oのピーク認識、(2) 一定時間後の8-OH-d G分取開始、(3) 一

定時間後の 8-OH-d G 分取終了、(4) 8-OH-d G 分画のミキシング、(5) HPLC-2 への注入を行うものであるが、より詳しくは以下のフローにより機能を実現している。

- (1) 2 3 3 XLにより試料をHPLC-1に注入する。
- (2) 設定時間 (T1)だけシステムを待機させる。
- (3) 2 3 3 XLがUV検出器シグナルのモニターを開始する。
- (4) 設定UVレベルを超える (ピーク感知) まで、システムを待機させる。
- (5) ピーク感知後、設定時間 (T2) だけシステムを待機させた後、2 3 3 XLバイアルチューブ内に分取を開始する。
- (6) 設定時間 (T3) 後、分取を終了させる。
- (7) 得られた分画を吸引、吐出により攪拌する。
- (8) 分画の一部をHPLC-2に注入する。

上記陰イオン交換樹脂を充填するカラムの長さは、特に制限はないが、陰イオン交換樹脂の粒子径、交換容量等によって、カラムを短くすることが可能であり、分析時間を短縮することができる。

上記UV検出器 1 4 は、陰イオン交換カラム (HPLC-1) 1 1 から溶出される画分をモニターし、試料中に含まれる 8-OH-r Guo の溶出位置を感知する。このように、8-OH-r Guo の溶出位置をUV検出器 1 4 でモニターすることによって、正確な 8-OH-d G の溶出時間が把握でき、それに合わせてカラムスイッチングバルブ 1 6 を作動させることにより、確実に 8-OH-d G を含有する画分を分取することができる。

上記逆相カラム (HPLC-2) 1 2 は、陰イオン交換カラム (HPLC-1) 1 1 から得られた 8-OH-d G を含有する画分を更に精製するものであり、逆相カラムの性質を有するものであれば、特に制限はない。市販品としては、YMC-Pack ODS-AM (S-5 μ m) (YMC社)、Shiseido Capcell Pac C18 MG (S-5 μ m) ((株)資生堂製) 等が挙げられる。

上記検出器 1 3 は、逆相カラム (HPLC-2) から得られた精製 8-OH-d G を測定するものであり、逆相カラム (HPLC-2) 1 2 の下流に設けられている。上記検出器 1 3 としては、電気化学検出器 (ECD)、液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LCMS) 等を用いることができる。また、上記電気化学検出器 (ECD) に関しては、2 種類の設定電圧を選ぶことにより、8-OH-d G のピークは固有の比率で表れるため、そのピークが 8-OH-d G であることを確認できる。

また、本発明の実施形態に係る 8-OH-d G の精製及び測定を実施するための分析装置は、連続運転を行うことにより大量の試料を処理する

ことが可能である。その場合、ガードカラム 35 の洗い洗浄液（C 液）は、0.5 M 硫酸アンモニウム：アセトニトリル＝7：3 程度の組成であることが好ましい。

以上説明したように、本発明の実施形態に係る 8-OH-d G の分析装置によれば、陰イオン交換カラム（HPLC-1）11 が試料中に含まれる 8-OH-d G を特異的に吸着し、試料中に含まれる夾雑物の大半を一度に取り除くことができる。また、UV 検出器 14 によって、8-OH-r G u o の溶出位置に基づき、確実に精製 8-OH-d G を分取でき、回収率、再現性に優れているといえる。また、連続運転を行うことにより大量の試料を処理することができる。また、上述した分析装置は比較的安価なため経済性にも優れている。

以下、図 1 に示す分析装置を用いて 8-OH-d G の精製方法及び測定方法の説明をする。（分取範囲（時間）の決定）8-OH-d G と 8-OH-r G u o と尿との混合物を図 1 示す分析装置に注入し、予め、8-OH-d G の分取範囲を決定しておく。図 3 は、8-OH-d G と 8-OH-r G u o と尿との混合物の分離パターンの一例であり、8-OH-d G の内部標準マーカとなる 8-OH-r G u o の位置確認を示す。このように、分取範囲を予め決定しておくことにより、8-OH-d G の正確な溶出時間が把握でき、それに合わせてカラムスイッチングバルブ 16 を作動させるように設定することで、確実に 8-OH-d G を含有する画分を分取することができる。なお、上述したように、図 1 において、オートサンプラー 17 の代わりに、サンプリングインジェクター（231XL）を用いた場合は、ピーク感知により 8-OH-r G u o との相対的位置により自動的に 8-OH-d G の分取範囲（時間）が決定されるため、分取範囲（時間）の設定をしておく必要がない。

（精製方法）

本発明の 8-OH-d G の精製方法は、試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製する第 1 の精製工程を有することを特徴とする。また、上述したように、8-OH-d G のみならず、8-OH-r G u o 等の負の電荷を有する酸化的損傷グアニンヌクレオシドにおいても、陰イオン交換クロマトグラフィーによって容易に精製、回収することができる。

第 1 の精製工程における溶出条件としては、カラム温度は 60～65℃、内径 1 mm のカラムの場合、流速が 17～20 μ l/min とすることが好ましい。

また、本発明の 8-OH-d G の精製方法は、予め、試料に 8-OH-r G u o を 8-OH-d G の内部標準マーカとして加えて、精製を行うことが好ましい。8-OH-r G u o を試料中に予め添加しておくこと、8-OH-r G u o が溶出された後、一定時間後に 8-OH-d G が溶出されるため、8-OH-r G u o の溶出位置を UV 検出器 14 でモニターすることによって、正確な 8-OH-d G の溶出位置（時間）が把握でき、確実に 8-OH-d G を含有する画分を分取することができる。

また、本発明の8-OH-d Gの精製方法は、予め、試料に8-OH-r G u oを8-OH-d Gの内部標準マーカとして加えて、陰イオン交換クロマトグラフィーによる第1の精製工程を行い、第1の精製工程で得られた8-OH-d Gを含有する画分を更に精製すること（第2の精製工程）が好ましい。

上記第2の精製工程としては、逆相クロマトグラフィーにより精製することが好ましい。逆相クロマトグラフィーに用いられる溶出液（B液）、温度条件等は、使用する逆相カラム（HPLC-2）12によって異なるため、それらは適宜決定される。例えば、逆相カラムとして、YMC-Pack ODS-AM（S-5 μ m）（YMC社）を用いてヒト尿を分析する場合は、カラム温度が約40℃、流速が0.9 ml/min程度とすることが好ましい。

（測定方法）

本発明の測定方法は、上述した精製方法によって得られた精製8-OH-d Gの量を測定する測定工程を有し、上述した電気化学検出器（ECD）、液体クロマトグラフィー質量分析装置（LCMS）等を用いて精製8-OH-d G量を測定できる。なお、上記測定方法は、8-OH-d Gのみならず、8-OH-r G u o等の精製酸化的損傷グアニンヌクレオシドの測定にも適用できる。

また、連続運転を行う場合、図1に示すようなオートサンプラー17を具備した装置においても、図2に示すようなサンプリングインジェクター27を具備した装置においても、定期的に8-OH-d Gの溶出位置をチェックすることが好ましい。

以上説明したように、本発明の酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法によれば、精製酸化的損傷グアニンヌクレオシドを回収率良く得られる。更に、第1の精製工程における陰イオン交換カラム（HPLC-1）の流速が微量であるため、溶離液（A液、B液）、洗浄液（C液）の消費が極めて少なく、精製後の廃液量も少量で済むため、環境保全の面からも好ましい。本発明の8-OH-d Gの精製方法によれば、確実に精製8-OH-d Gを分取でき、8-OH-d Gのピーク付近において夾雑物がほとんどない画分を得ることができる。また、連続運転を行っても、8-OH-r G u oピーク感知により、サンプル毎の分取範囲のズレに対応して、確実に8-OH-d Gを含有する画分を分取することができる。また、本発明の測定方法は、上記精製方法によって得られた精製8-OH-d G又は8-OH-r G u o等の精製酸化的損傷グアニンヌクレオシドを測定するので、非常に精度が高く、再現性を有する。

なお、本発明の技術範囲は、上記実施形態に限定されるものではなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲において種々の変更を加えることが可能である。例えば、溶離液（A液、B液）、洗浄液（C液）の組成等は、使用するカラム（充填剤）により適宜変更可能である。

本発明の酸化的損傷グアニンヌクレオシドの測定方法は、例えば、個人個人の発癌リスクの評価、活性酸素関連の様々な疾患（糖尿病等）の

予測・診断、老化度、あるいは一般的健康の評価に用いることができる。

上記測定方法により得られた結果の評価方法として、例えば8-OH-d Gの場合、8-OH-d G標準溶液を随時、尿試料の他に分析装置に注入し、そのピーク面積との比較により算出された試料中の8-OH-d G濃度をクレアチニンなどの標準物質の濃度で割った値、あるいは24時間分の尿中の8-OH-d G量として算出する。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

(実施例1)

〈尿試料1の調製〉

ヒトの尿を1mlずつ2本のエッペンドルフチューブに取り、-20℃で凍結した。凍結した尿を解凍して均一な液とした後、その100μlを取り、微酸性溶液（組成；0.6mM硫酸を96ml、アセトニトリル4ml）で2倍に希釈し、8-OH-d G及び8-OH-r Guoを各12μg加えた。更に2M酢酸ナトリウム（pH4.5）を6.7μl加え、pHを7以下にした。これをよく攪拌した後、15000回転、5分間遠心分離を行い、その上清を尿試料1とした。

上記のように調製した尿試料1を10μl陰イオン交換カラム（充填剤（Bio Rad製）の粒径12μm、内径1mm、ガードカラムの長さ4cm、本カラムの長さ12cm）によって精製した。この分離パターンを図3に示す。なお、この分離パターンは、UV検出器（「UV-8020」、東ソー製）（吸光波長254nm）を用いて検出した。

図3に示すように、8-OH-d Gは、8-OH-r Guoの溶出から一定の時間差を置いて溶出された。そのため、8-OH-r Guoの溶出をモニターすることにより、正確な8-OH-d Gの溶出位置を把握でき、確実に8-OH-d Gを有する画分を得ることが可能である。

(実施例2)

〈尿試料2の調製〉

ヒトの尿を1mlずつ2本のエッペンドルフチューブに取り、-20℃で凍結した。凍結した尿を解凍して均一な液とした後、その100μlを取り、微酸性溶液（組成；0.6mM硫酸を96ml、アセトニトリル4ml）で2倍に希釈し、8-OH-r Guo 12μg加えた。更に2M酢酸ナトリウム（pH4.5）を6.7μl加え、pHを7以下にした。これをよく攪拌した後、15000回転、5分間遠心分離を行い、その上清を尿試料2とした。

〈陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製〉

陰イオン交換カラムを用いて、ヒトの尿試料2の精製を行い、8-OH-d Gを含有する画分（34～41分）を得た。なお、0.3mM硫酸、2%アセトニトリル溶離液（A液）を用い、カラム温度は65℃、

流速は $17 \mu\text{l}/\text{min}$ とした。このときの分離パターンを図 4 に示す。なお、上記陰イオン交換カラムは、アミネックス HPX-72S カラム (Bio Rad 製) ($300 \times 7.8 \text{ mm}$ 、粒径 $12 \mu\text{m}$ 、架橋度 8%、sulfate 型) の充填剤を内径 1 mm のカラム (ガードカラムの長さ 4 cm 、本カラムの長さ 12 cm) に詰めかえて作製したものである。また、この分離パターンは、UV 検出器 (「UV-8020」、東ソー製) (吸光波長 254 nm) を用いて検出した。

〈逆相クロマトグラフィーによる精製〉

陰イオン交換クロマトグラフィーにより得た 8-OH-dG を含有する画分 (34~41 分) $119 \mu\text{l}$ を自動的に逆相クロマトグラフィーに注入した。なお、逆相カラムとして、Shiseido Capcell Pak C18 MG (S-5 μm) ($250 \times 4.6 \text{ mm}$) を用い、 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.7; これは 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.7) を希釈して調製したものであり、pH は多少異なる)、5% MeOH 溶離液 (B 液) を用い、カラム温度は 40°C 、流速 $0.8 \text{ ml}/\text{min}$ とした。その分離パターンを図 5 に示す。なお、この分離パターンは、電気化学検出器 (「ESA Coulochem II」、esa 社) (電圧: ガードセル 350 mV ; チャンネル 1、 150 mV ; チャンネル 2、 300 mV) を用いて検出した。

(実施例 3)

〈陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製〉

ヒト尿試料 2 のほかの分離例を図 6 に示す。ヒト尿試料 2 を $20 \mu\text{l}$ 注入した。分離条件は、カラム MCI GEL CA08F ($7 \mu\text{m}$); 内径 1.5 mm 、長さ (ガードカラム) 5 cm 、(本カラム) 15 cm ; 温度、 65°C ; 流速、 $36 \mu\text{l}/\text{分}$; 溶離液、 0.3 mM 硫酸、2% アセトニトリル (A 液) であり、UV 検出器 (「UV-8020」、東ソー製) (吸光波長 254 nm) を用いて検出した。

(実施例 4)

〈逆相クロマトグラフィーによる精製〉

陰イオン交換クロマトグラフィーにより得た 8-OH-dG を含有する画分を逆相クロマトグラフィーにより分析した他の例を図 7 に示す。なお、逆相カラムとして、YMC-Pack ODS-AM (S-5 μm) ($250 \times 4.6 \text{ mm}$) を用い、 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2; これは 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を希釈して調製したものであり、pH は多少異なる)、5% MeOH 溶離液 (B 液) を用い、カラム温度は 40°C 、流速 $0.9 \text{ ml}/\text{min}$ とした。なお、この分離パターンは、電気化学検出器 (「ESA

Coulochem II」、esa 社) (電圧: ガードセル 350 mV ; チャンネル 1、 150 mV ; チャンネル 2、 300 mV) を用いて検出した。

図 5 及び図 7 から明らかなように、上述した方法によれば、精製 8-OH-dG のピーク付近には夾雑物がなく、8-OH-dG の測定の精度に優れていた。

(実施例 5)

〈尿試料 3 の調製〉

ラットの尿を 1 ml ずつ 2 本のエッペンドルフチューブに取り、-20℃で凍結した。凍結した尿を解凍して均一な液とした後、その 100 μ l を取り、微酸性溶液（組成；0.6 mM 硫酸を 96 ml、アセトニトリル 4 ml）で 2 倍に希釈し、8-OH-rGuo 12 μ g 加えた。更に 2 M 酢酸ナトリウム（pH 4.5）を 6.7 μ l 加え、pH を 7 以下にした。これをよく攪拌した後、15000 回転、5 分間遠心分離を行い、その上清を尿試料 3 とした。

〈陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製〉陰イオン交換カラムを用いて、ラットの尿試料 3 の精製を行い、8-OH-dG を含有する画分を得た。なお、0.3 mM 硫酸、2% アセトニトリル溶離液（A 液）を用い、カラム温度は 65℃、流速は 17 μ l/min とした。また、上記陰イオン交換カラムは、アミネックス HPX-72S カラム（Bio Rad 製）（300 \times 7.8 mm、粒径 12 μ m、架橋度 8%、sulfate 型）の充填剤を内径 1 mm のカラム（ガードカラムの長さ 5 cm、本カラムの長さ 15 cm）に詰めかえて作製したものである。

〈逆相クロマトグラフィーによる精製〉

上記陰イオン交換クロマトグラフィーにより得た 8-OH-dG を含有する画分を自動的に逆相カラムに注入し分析した。その分離パターンを図 8 に示す。なお、逆相カラムとして、YMC-Pack ODS-AM（S-5 μ m）（300 \times 4.6 mm）を用い、10 mM リン酸緩衝液（pH 7.2；これは 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.2）を希釈して調製したものであり、pH は多少異なる）、5% MeOH 溶離液（B 液）を用い、カラム温度は 40℃、流速 0.9 ml/min とした。なお、この分離パターンは、電気化学検出器（「ESA Coulochem II」、esa 社）（電圧：ガードセル 350 mV；チャンネル 1、150 mV；チャンネル 2、300 mV）を用いて検出した。

(実施例 6)

ラット尿の陰イオン交換クロマトグラフィー（MCI、7 μ m 粒子）により得た 8-OH-dG を含有する画分を逆相クロマトグラフィーにより分析したほかの例を図 9 に示す。尚、逆相カラムとして、Shiseido Capcell Pak C18 MG（S-5 μ m）（250 \times 4.6 mm）を用い、10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0；これは 0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.0）を希釈して調製したものであり、pH は多少異なる）、2% MeOH 溶液を用い、カラム温度は、46℃、流速 0.75 ml/分とした。なお、この分離パターンは、電気化学検出器（ESA Coulochem II, ESA 社）（電圧：ガードセル 400 mV；チャンネル 1、280 mV；チャンネル 2、350 mV）を用いて検出した。

図 8 及び図 9 から明らかなように、ラットの尿試料 3 においても、8-OH-dG の測定が可能であった。

産業上の利用性

本発明の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製方法は、8-OH-dG、8-OH-rGuo等の酸化的損傷グアニンヌクレオシドを回収率良く、精製・回収できる。

また、特に8-OH-dGの精製においては、予め、試料に8-OH-rGuoを8-OH-dGの内部標準マーカとして加えることにより、正確な8-OH-dGの溶出時間が把握でき、確実に8-OH-dGを含有する画分を分取することができる。更に、第1の精製工程における陰イオン交換カラム（HPLC-1）の流速が微量であるため、溶離液（A液）、洗浄液（C液）の消費が極めて少なく、精製後の廃液量も少量で済むため、環境保全の面からも好ましい。また、本発明の測定方法は、上記精製方法によって得られた精製8-OH-dG、又は8-OH-rGuo等の精製酸化的損傷グアニンヌクレオシドを測定するので、非常に精度が高く、再現性を有する。本発明の8-OH-dGの分析装置によれば、陰イオン交換カラム（HPLC-1）が、試料中に含まれる8-OH-dGを特異的に吸着するため回収率が非常に高く、試料中にふくまれる夾雑物を一度に取り除くことができる。また、連続運転を行うことによって大量処理が可能である。また、この分析装置は比較的安価なため、経済性にも優れている。

請求の範囲

1. DNA又はRNA中のグアニンが損傷を受けた結果生じる酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法であって、試料中に含まれる酸化的損傷グアニンヌクレオシドを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製する第1の精製工程を有することを特徴とする酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法。
2. 前記酸化的損傷グアニンヌクレオシドが、8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）であることを特徴とする請求項1記載の酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法。
3. 試料中に含まれる8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）の精製方法であって、予め、試料に8-ヒドロキシグアノシン（リボヌクレオシド）（8-OH-rGuo）を8-OH-dGの内部標準マーカとして加えて、精製を行うことを特徴とする8-OH-dGの精製方法。
4. 試料中に含まれる8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）の精製方法であって、予め、試料に8-ヒドロキシグアノシン（リボヌクレオシド）（8-OH-rGuo）を加えて、該試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製する第1の精製工程と、第1の精製工程で得られた8-OH-dGを含有する画分を逆相クロマトグラフィーによって更に精製する第2の精製工程とを有することを特徴とする8-OH-dGの精製方法。
5. 前記試料が尿であることを特徴とする請求項1又は2に記載の酸化的損傷グアニンヌクレオシドの精製方法。
6. 前記試料が尿であることを特徴とする請求項3又は4に記載の8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）の精製方法。
7. 更に、請求項1、2又は5記載の精製方法によって得られた精製酸化的損傷グアニンヌクレオシドを測定する測定工程を有することを特徴とする酸化的損傷グアニンヌクレオシドの測定方法。
8. 請求項3、4又は6記載の精製方法によって得られた精製8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）を測定する測定工程を有することを特徴とする8-OH-dGの測定方法。
9. 前記精製8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dG）の測定が、陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて

(1) リボヌクレオシド 8-OH-r G u o のピーク認識、
(2) 一定時間後の 8-OH-d G 分取開始、
(3) 一定時間後の 8-OH-d G 分取終了、
(4) 適宜、8-OH-d G 分画のミキシング、
の順序で行われ、ついで、
逆相カラムへ注入して行われることを特徴とする請求項 8 に記載の 8-OH-d G の測定方法。

10. 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-d G) の精製および測定を実施するための装置であって、

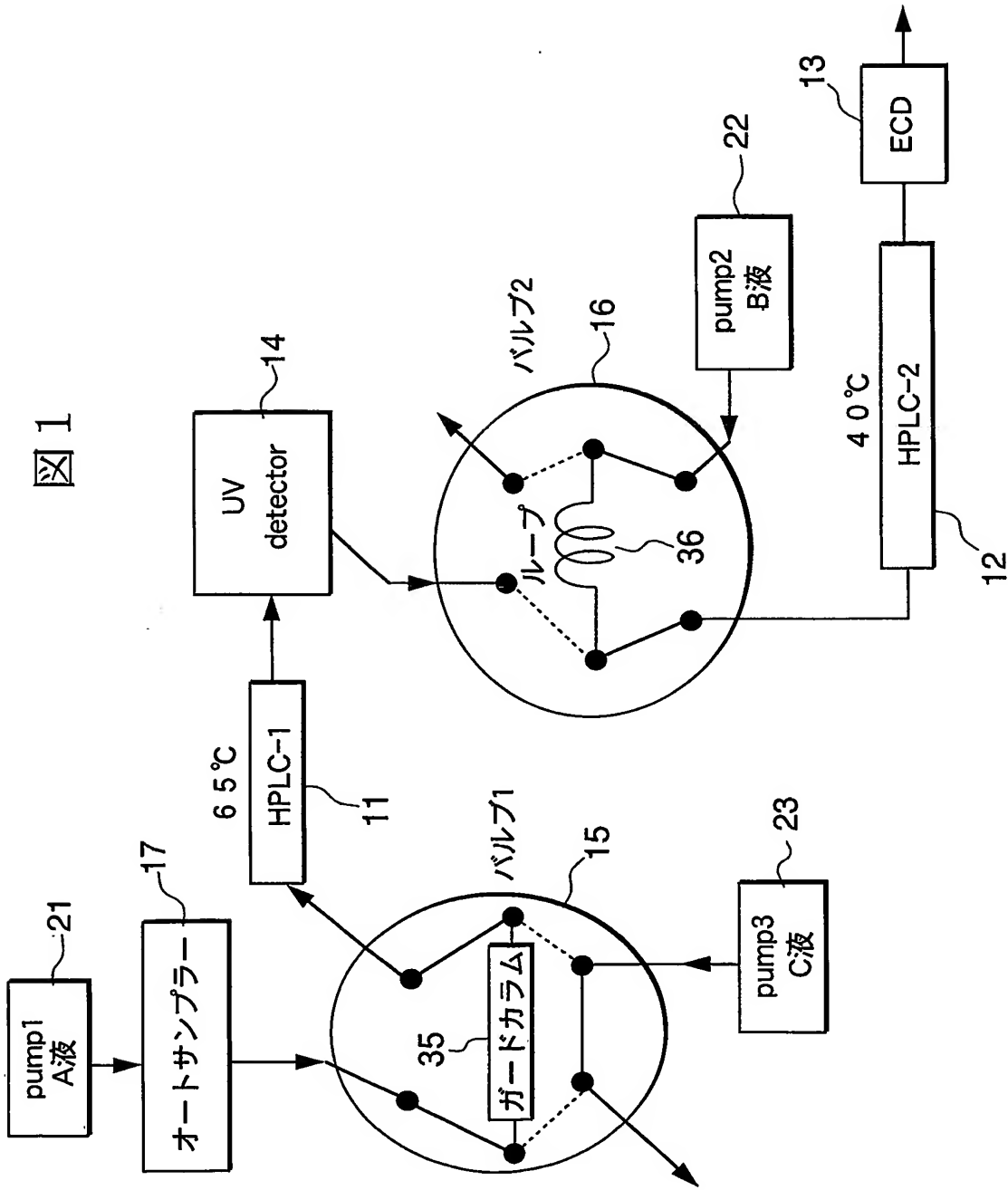
試料中に含まれる 8-OH-d G を特異的に吸着する陰イオン交換カラム (HPLC-1) と、

8-ヒドロキシグアノシン (リボヌクレオシド) (8-OH-r G u o) の溶出位置を感知する UV 検出器と、陰イオン交換カラム (HPLC-1) から得られた 8-OH-d G を含有する画分を更に精製する逆相カラム (HPLC-2) と、逆相カラム (HPLC-2) から得られた精製 8-OH-d G を測定する検出器とを具備することを特徴とする分析装置。

11. 試料中に含まれる 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-d G) をカラムクロマトグラフィーにより回収する処理を制御するためのプログラムであって、

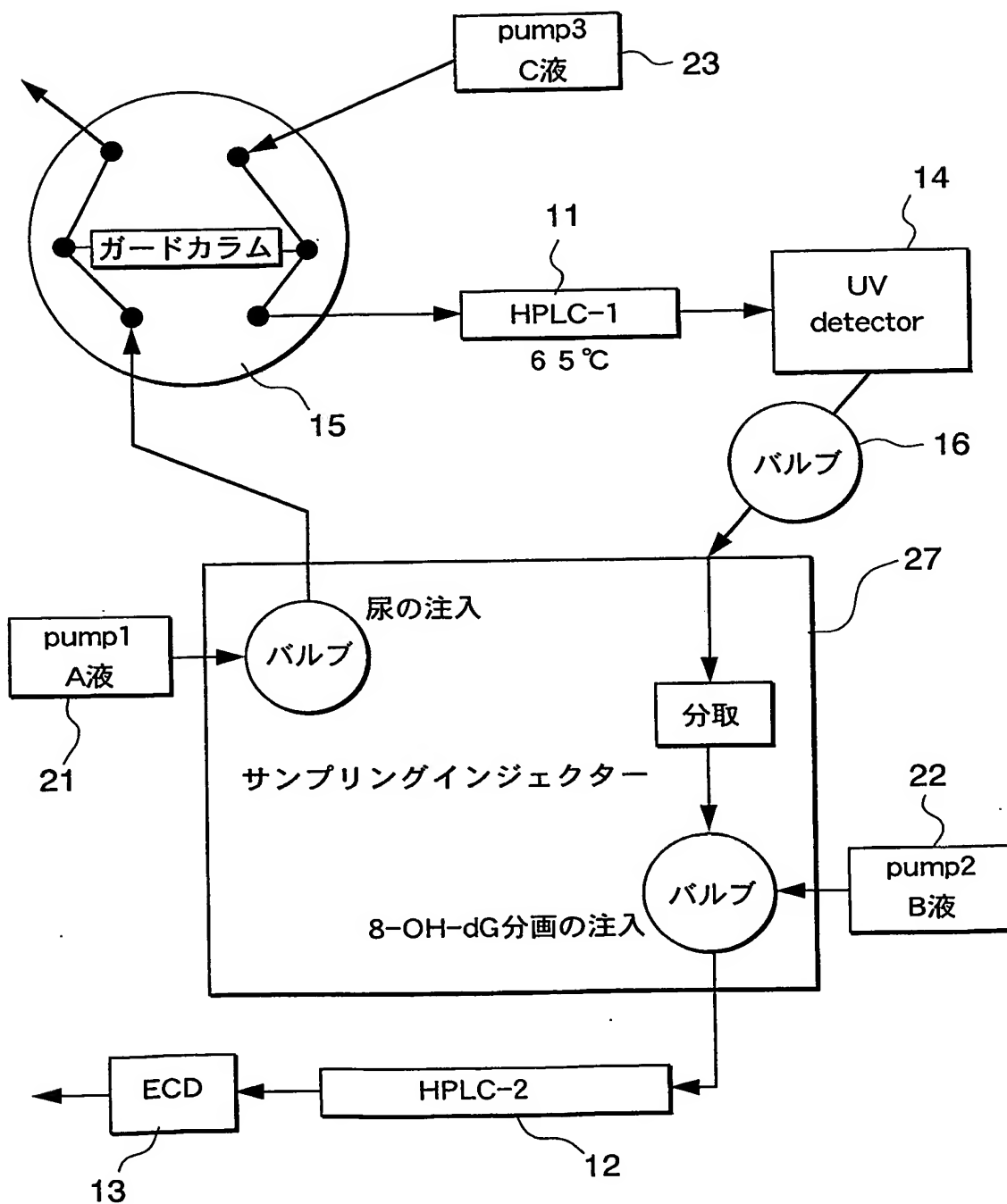
予め試料中に加えておいたマーカー (8-OH-r G u o) のピークシグナルを UV 検出器より受け、一定時間後の 8-OH-d G 溶出時にサンプラーに接続されたバルブを開くシグナルを出力し、分取を開始し、更に一定時間後に分取終了シグナルを出力し、

次いで、得られた 8-OH-d G 分画を第二の精製カラムへ注入するためのシグナルを出力し、カラムから溶出する被検出物質 (8-OH-d G) を精製・回収する処理をコンピュータに行われるための制御プログラム。



2/9

図 2



3/9

3

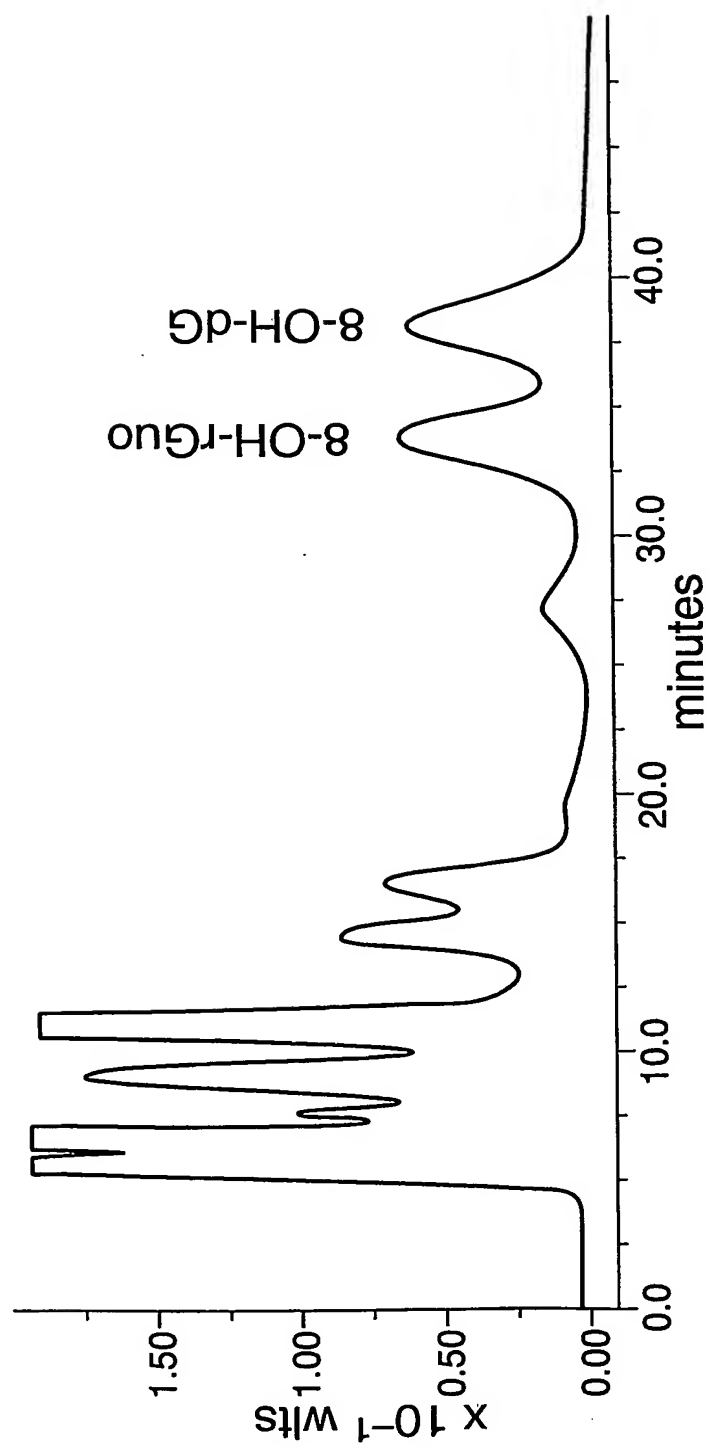
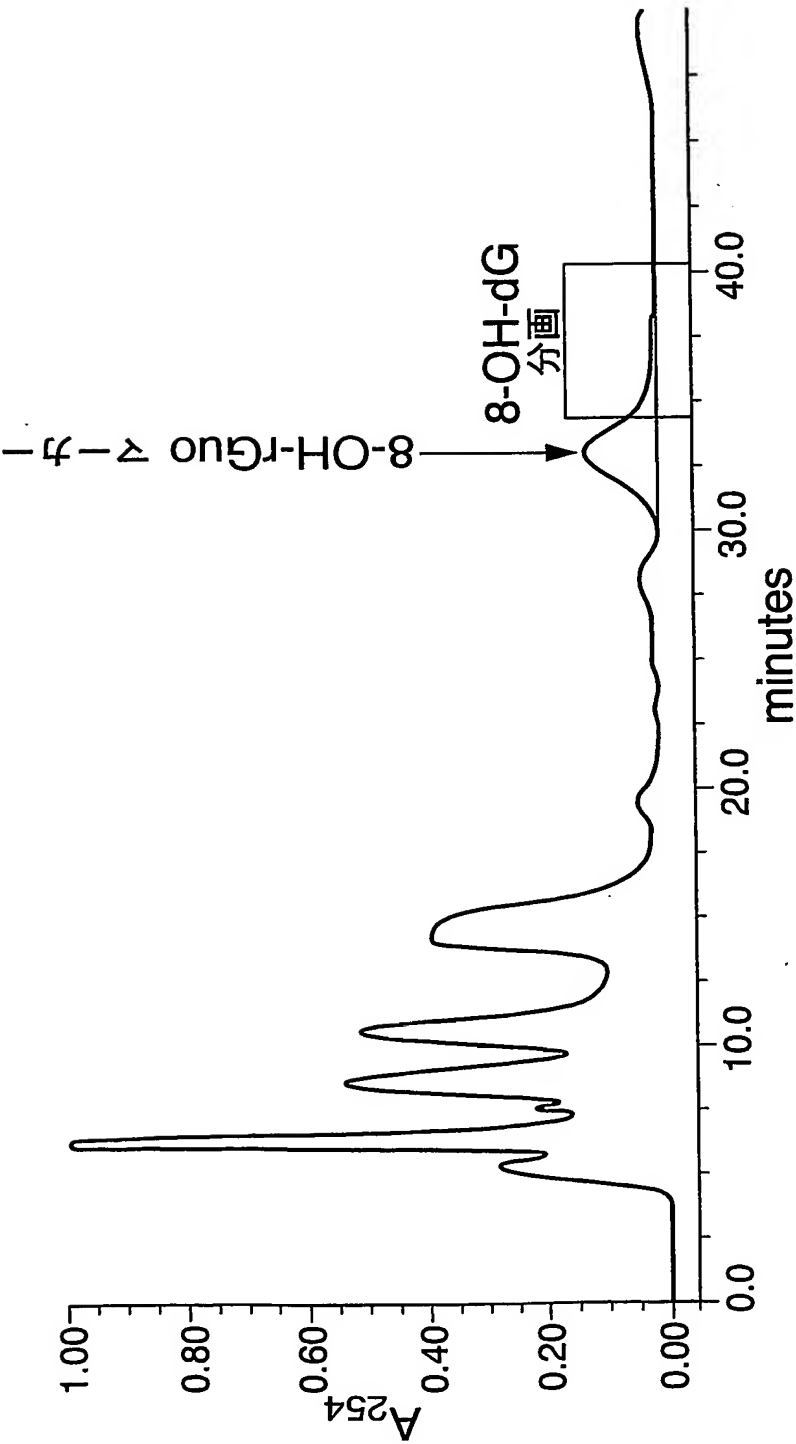


図4



5/9

図 5

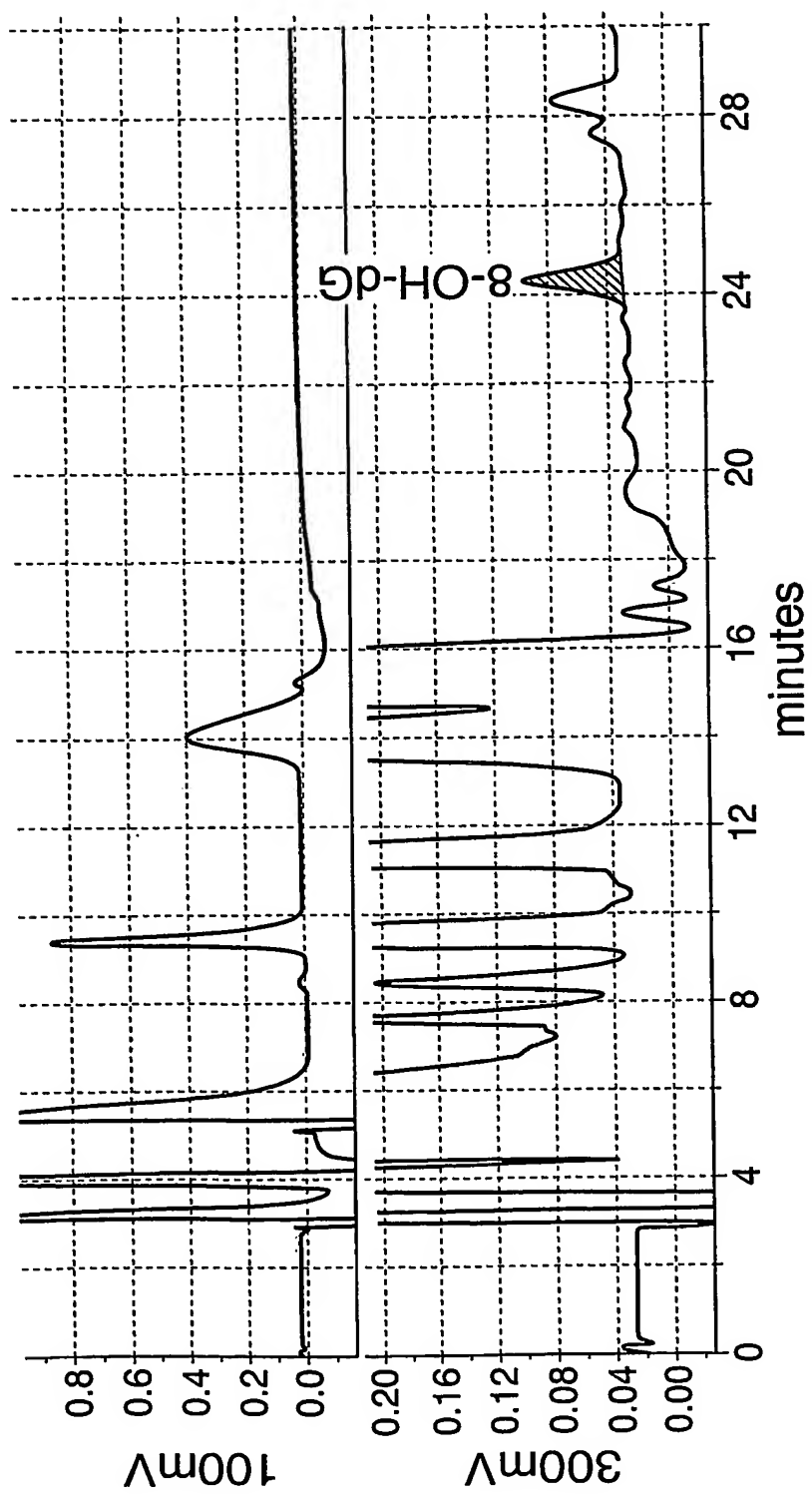
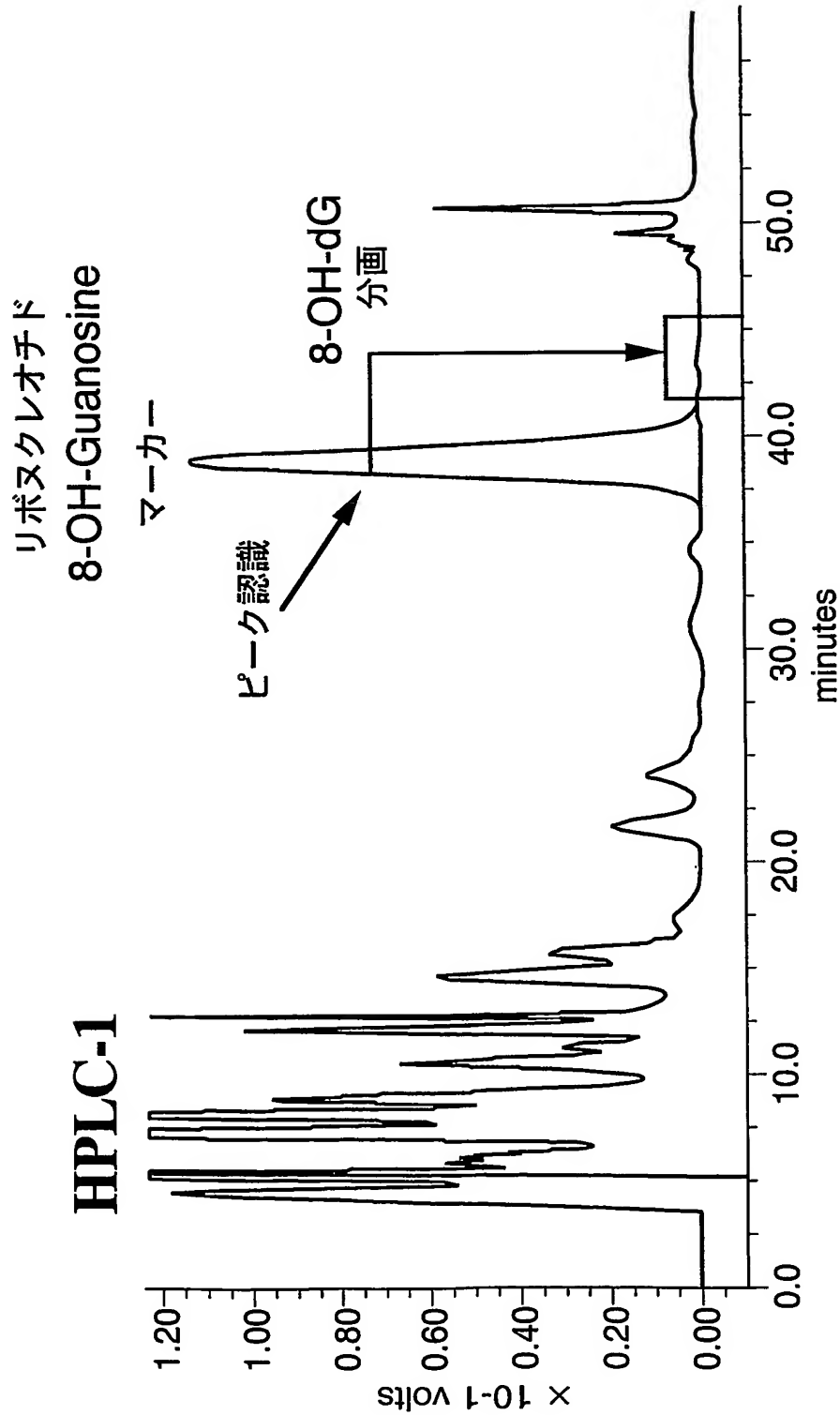
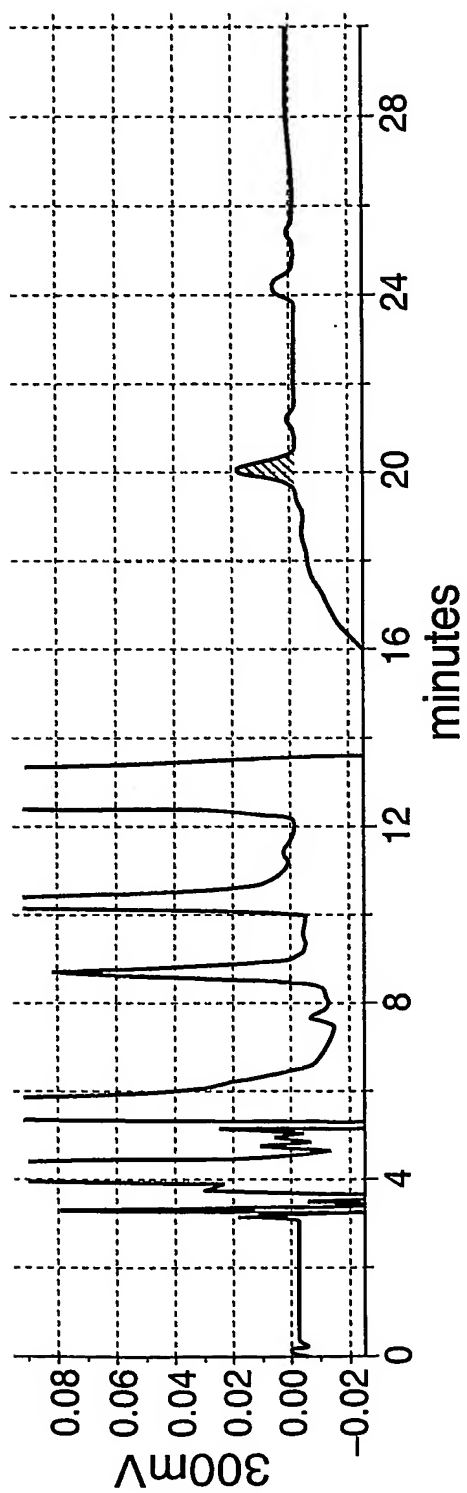


図 6



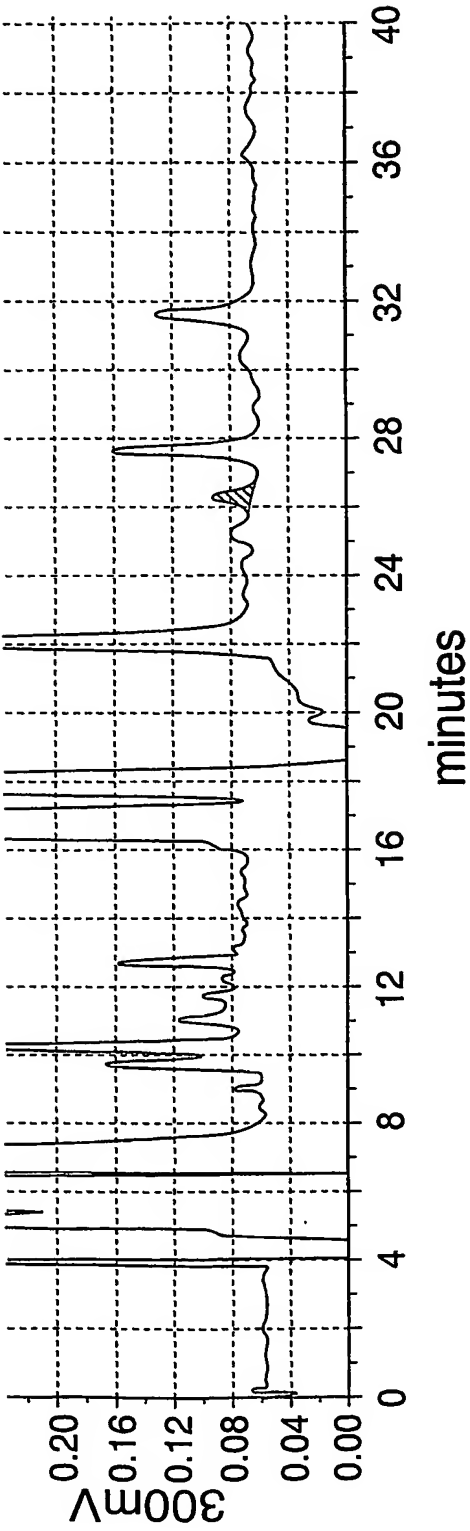
7/9

図 7



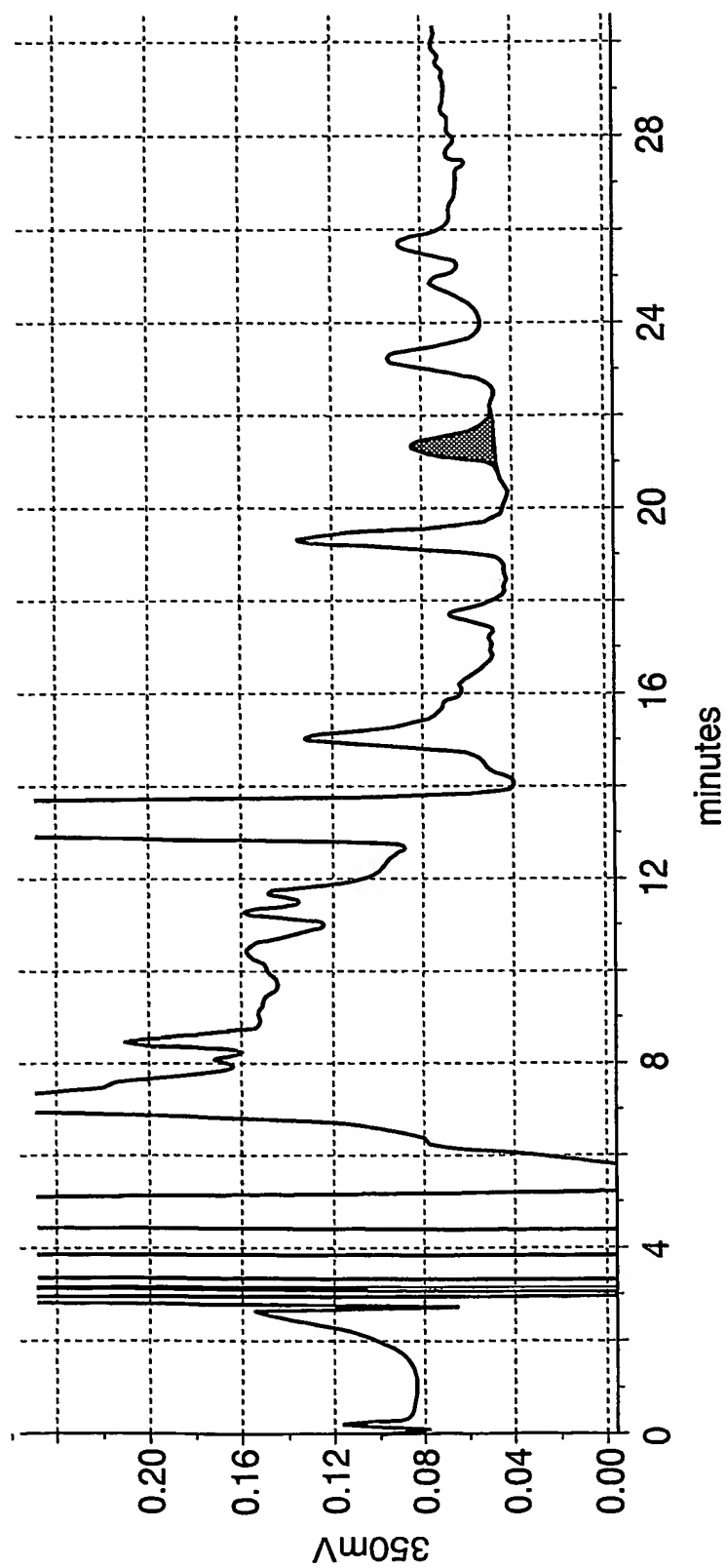
8/9

図 8



9/9

図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N30/88, B01D15/08, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N30/88, B01D15/08, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS, Online

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Steffen Loft, 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE AS A URINARY BIOMARKER OF OXIDATIVE DNA DAMAGE, Journal of Toxicology and Environmental Health, <u>Vol.40</u> , pages 391 to 404, 1993	1-11
A	Jeen-Woo Park, Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, Carcinogenesis, <u>Vol.10</u> , No.5, pages 827 to 832, 1989	1-11
A	JP 8-189929 A (Nikken Foods Co., Ltd.), 23 July, 1996 (23.07.96), (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26 May, 2003 (26.05.03)	Date of mailing of the international search report 10 June, 2003 (10.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03007

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 10 relate to a purification method involving the step of purifying an oxidatively injured guanine nucleoside by anion exchange chromatography, a measurement method and an apparatus for the purification or the measurement, while the invention according to claim 11 relate to a controlling program for collecting 8-hydroxydeoxyguanosine with the use of two purification columns. It cannot be considered that there is a general inventive concept common to these groups of inventions.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 30/88 B01D 15/08 C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 30/88 B01D 15/08 C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS Online

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Steffen Loft, 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE AS A URINARY BIOMARKER OF OXIDATIVE DNA DAMAGE, Jorunal of Toxicology and Environmental Health, vol. 40, p. 391-404, 1993	1-11
A	Jeen-Woo Park, Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, Carcinogenesis, vol. 10, no. 5, p. 827-832, 1989	1-11
A	JP 8-189929 A(日研フード株式会社)1996. 07. 23 (ファミリー無し)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 05. 03

国際調査報告の発送日

10.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩



2J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-10に係る発明は、酸化損傷グアニンヌクレオシドを、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製する工程を含む精製方法、測定方法、精製又は測定のための装置であるが、請求の範囲11に係る発明は、8-ヒドロキシデオキシグアノシンを2つの精製カラムを用いて回収するための制御プログラムに係る発明であり、両者の間に、共通する一般的発明概念が存在するとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。